

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ MARQUES ASSAD

**BIOPROSPEÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DA PLANTA *Vochysia divergens* Pohl (PANTANAL - BRASIL)**

CURITIBA

2017

BEATRIZ MARQUES ASSAD

**BIOPROSPEÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA
PLANTA *Vochysia divergens* Pohl (PANTANAL - BRASIL)**

Monografia apresentada como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Departamento de
Genética, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Chirlei Glienke

Co-orientadora: Daiani Savi

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Paraná pelo suporte estrutural e de aprendizado disponibilizado para a formação dos discentes, em especial do curso de Ciências Biológicas.

Agradeço também à UFPR/Tesouro Nacional, pela bolsa de iniciação científica durante minha passagem pelo Laboratório de Genética de Microorganismos (LabGeM).

À minha orientadora Chirlei Glienke e co-orientadora Daiani Savi, pelos ensinamentos, apoio e suporte durante não só o meu projeto de monografia, mas sim todo o meu período como estagiária, que acrescentou muito na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus colegas do LabGeM, em especial a Kariman e Francielly, pela ajuda e conversas nas horas difíceis no laboratório e na vida.

Às minhas amigas de classe Aline, Beatriz e Rebekah, pelas risadas, apoio, trabalhos pela madrugada, confidências, festas, companhia na hora do nosso “RU” de todo dia, etc. Por todos os momentos que passamos juntas.

Aos meus avós, tios, primas e irmãos, que sempre me apoiaram e investiram em cada passo do meu crescimento acadêmico e profissional, principalmente nas horas mais difíceis. Em especial, a minha mãe, Yara. Minha heroína, guerreira, que sempre colocou os filhos acima de tudo, e faz questão que a educação seja nossa prioridade.

E ao meu namorado Vadir, que foi o meu porto seguro, me ajudando seja na realização de trabalhos acadêmicos ou dando uma palavra de conforto quando não havia ânimo nem forças para continuar a graduação. Sem o seu suporte ficaria mais difícil, muito obrigada meu amor.

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior das plantas, sem lhes causar dano, fornecendo a elas proteção através da produção de metabólitos secundários, originados muitas vezes evolutivamente das próprias plantas. Em cultura de tecidos de plantas medicinais o surgimento de microrganismos endofíticos é frequente, sendo pesquisas com esse tipo de plantas muito comuns em busca de novas drogas. Essa busca se torna essencial frente ao surgimento de novas bactéria super-resistentes e de células cancerígenas de difícil tratamento, já que o tempo para a descoberta de compostos com potencial, é relativamente elevado. O objetivo deste trabalho, portanto, é produzir e avaliar a atividade citotóxica e antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos, isolados da planta *Vochysia divergens* Pohl, contra células tumorais e bactérias patogênicas humanas. Para isso, cinco linhagens de fungos de dois novos gêneros pertencentes à família Xylariaceae e um isolado de *Daldinia* sp. foram selecionados devido ao potencial antifúngico de seus metabólitos secundários verificados previamente. Para a obtenção dos metabólitos secundários, os fungos foram submetidos a processos de fermentação por 21 dias (24°C e 180 rpm) em erlenmeyers (500 mL) contendo 250 mL dos meios de cultura BD, Czapek, ME e M1D. Parte dos extratos secos foram diluídos em DMSO nas concentrações de 50 e 5 mg/mL para a avaliação da atividade citotóxica contra células de Melanoma B16F10, utilizando a técnica de MTT com dois tempos de tratamento (24 e 48h). Outra parte dos extratos secos foram diluídos em metanol, a 10mg/mL, 1mg/mL e 0,5 mg/mL para o teste de difusão em disco, contra os patógenos clínicos: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase). Contra as células tumorais, o extrato LGMF1123 M1D obteve destaque, apresentando valores de IC₅₀=11,6 µg/mL (24h) e 6,798 µg/mL (48h). Já contra os patógenos clínicos, houve grande variação no tamanho do halo de inibição formado. *K. pneumoniae* se mostrou susceptível a 55,5% dos extratos. Contra MRSA, 47,2% dos extratos tiveram ação. O patógeno *A. baumannii* se mostrou a bactéria mais susceptível, já que todos os extratos tiveram atividade contra ela. Este resultado se mostra importante já que *A. baumannii* surgiu como um dos mais problemáticos microrganismos para instituições de saúde globalmente, sendo o um dos patógenos nosocomiais mais importantes. Já *S. aureus* (MSSA) se mostrou a bactéria menos susceptível, já que apenas um dos extratos apresentou atividade. Os resultados obtidos por esses compostos se mostram promissores. Contribuindo assim, para evidenciar o potencial em produzir compostos bioativos de endofíticos da planta *V. divergens*, como os da família Xylariaceae, e de outras plantas provenientes do Pantanal.

Palavras-chave: Xylariaceae; citotoxicidade; resistência bacteriana.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit the interior of the plants, without causing them harm, providing them protection through the production of secondary metabolites, often evolutionarily originated from the plants themselves. In tissue culture of medicinal plants, the emergence of endophytic microorganisms is frequent, being investigations with this type of plants very common in search of new drugs. This search becomes essential in the face of the emergence of new super-resistant bacteria and difficult-to-treat cancer cells, since the time for the discovery of potential compounds is relatively high. The objective of this work, therefore, is to produce and evaluate the cytotoxic and antimicrobial activity of endophytic fungi extracts isolated from the *Vochysia divergens* Pohl plant against tumor cells and human pathogenic bacteria. For this, five fungal strains of two new genera belonging to the family Xylariaceae and one isolate of *Daldinia* sp. were selected because of the antifungal potential of their previously verified secondary metabolites. To obtain the secondary metabolites, the fungi were submitted to fermentation for 21 days (24°C and 180 rpm) in erlenmeyers (500 mL) containing 250 mL of BD, Czapek, ME and M1D culture media. Part of the dry extracts were diluted in 50 and 5 mg / mL DMSO for evaluation of cytotoxic activity against B16F10 Melanoma cells using the MTT technique with two treatment times (24 and 48h). Another part of the dry extracts was diluted in methanol at 10mg / mL, 1mg / mL and 0.5mg / mL for the disk diffusion test against clinical pathogens: Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae* producing the KPC (*K. pneumoniae* carbapemase) enzyme. In contrast to the tumor cells, the M1D extract LGMF1123 was highlighted, presenting values of $IC_{50} = 11.6 \mu\text{g} / \text{mL}$ (24h) and $6,798 \mu\text{g} / \text{mL}$ (48h). As against the clinical pathogens, there was great variation in the size of the inhibition halo formed. The bacteria *K. pneumoniae* was susceptible to 55.5% of the extracts. Against MRSA, 47.2% of the extracts acted. The pathogen *A. baumannii* showed the most susceptible bacteria, since all extracts had activity against it. This result is important since *A. baumannii* emerged as one of the most problematic microorganisms for health institutions globally, being one of the most important nosocomial pathogens. *S. aureus* (MSSA) showed to be less susceptible, since only one of the extracts presented activity. The results obtained by these compounds are shown to be promising. Thus, contributing to the potential of producing bioactive compounds of plant endophytes *V. divergens*, such as those of the family Xylariaceae, and other plants from the Pantanal.

Keyword: Xylariaceae; cytotoxicity; bacterial resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS.....	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	10
3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS	11
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	12
3.4 CITOTOXICIDADE E ENDÓFITOS.....	14
3.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	18
4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS	18
4.3 TESTES DOS EXTRATOS	19
4.3.1 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	19
4.3.2 CITOTOXICIDADE CONTRA CÉLULAS TUMORAIS.....	19
4.3.2 TESTE CONTRA PATÓGENOS CLÍNICOS	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 PRODUÇÃO DE EXTRATOS.....	21
5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	21
5.3 ATIVIDADE MICROBIANA.....	23
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, que consiste na exploração e investigação de plantas, animais e microrganismos, como os fungos endofíticos, a fim de identificar princípios ativos e ou enzimas relevantes para uma ampla gama de setores e atividades (SACCARO JR, 2011). Tais atividades incluem a biotecnologia, agricultura, nutrição, indústria farmacêutica e de cosméticos, biorremediação, biomonitoramento, saúde, produção de combustível por meio de biomassa, entre outros. Os alvos da bioprospecção são coletivamente chamados de recursos genéticos (SACCARO JR, 2011).

As plantas utilizadas na medicina popular, bem como os seus microrganismos endofíticos, constituem uma fonte promissora na obtenção de princípios ativos com atividades biológicas de interesse, principalmente para a sua utilização contra diferentes patologias (LÓPEZ, 2010). Microrganismos endofíticos são bactérias (incluindo actinomicetos) e fungos, que por um período do seu ciclo de vida colonizam inter e / ou intra-celularmente os tecidos saudáveis da planta hospedeira sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (AZEVEDO; MELO; AZEVEDO, 1998; SCHULZ; BOYLE, 2005; TAN; ZOU, 2001). Eles existem, provavelmente, em todas as plantas, podendo uma mesma planta abrigar vários endófitos (AZEVEDO; MELO; AZEVEDO, 1998).

O endófito e a planta estabelecem uma estreita relação, e a ausência de patogenicidade pelo fungo depende da não ocorrência de alterações, ocasionadas quando o hospedeiro sofre algum tipo de stress ou em mudanças fisiológicas em alguns organismos envolvidos (ANDRADE, 2015). Quando a relação fungo-planta está equilibrada, o endofítico, através da produção de compostos, pode atuar na diminuição da herbivoria sobre os tecidos vegetais ou confere resistência a fitopatógenos, além da produção de fitorreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, entre outros (NETO, 2004). Juntamente com a produção de novos compostos, muitos endófitos mostraram uma capacidade natural para a degradação xenobiótica ou podem atuar como vetores para introduzir traços degradativos. A capacidade de alguns endófitos para mostrar resistência aos metais pesados / antimicrobianos e degradar compostos orgânicos provavelmente decorre da exposição a diversos compostos no nicho planta / solo (RYAN, 2008).

A formação de novos composto bioativos é gerada muitas vezes pela relação simbiótica devido a ocorrência de hibridização entre a planta e o fungo, que leva a variabilidade genética (SAIKKONEN et al, 1998). Entre esta associação planta-microrganismos, endófitos acabam demonstrando capacidade para a produção de alguns fitoquímicos caracteristicamente originados da planta (TAN; ZOU, 2001). Esses fungos poderiam ainda ser alterados geneticamente passando a expressar genes de interesse, colaborando assim para aumentar os

níveis de produtividade das plantas medicinais e de outras culturas de interesse estratégico (NETO, 2004). E essa poderia ser a razão do porque alguns endofíticos conseguirem produzir fitoquímicos caracteristicamente originados da planta.

Um grupo de plantas medicinais ainda pouco exploradas, são as localizadas no Pantanal Sul Mato-grossense. O Pantanal é um ecossistema de encontro de diferentes províncias fitogeográficas tais como o Cerrado, florestas estacionais, Chaco, Amazônia e Mata Atlântica. Neste encontro de biomas ocorre o intercâmbio de várias espécies animais e vegetais (POTT; POTT, 2009; POTT et al, 2011) e espera-se que o mesmo seja verdadeiro para microrganismos.

Uma das plantas medicinais presentes no Pantanal, é *Vochysia divergens* (Cambará), planta comumente usada em medicina popular contra infecções e asma (HESS et al, 1995). O cambará está particularmente distribuído no Pantanal Mato-grossense, ocupando, portanto, áreas sujeitas a alagamento sazonal (HESS et al, 1995), sendo umas das plantas tolerantes a esses altos níveis de inundação (ARIEIRA, 2006). Apesar da sua ampla utilização como planta medicinal, existem poucos relatos da comunidade endofítica do cambará. Savi et al. (2015) em um trabalho de bioprospecção de endófitos da planta *V. divergens*, isolaram e identificaram a linhagem *Microbispora* sp. LGMB259, a qual produziu beta-carbolinas com alta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas selecionadas, moderada atividade antifúngica e considerável atividade citotóxica contra as linhagens celulares cancerígenas humanas PC3 e A549. Hokama et al. (2017) explorou a biodiversidade de fungos dessa mesma planta e avaliaram a atividade de extratos produzidos pelos endófitos contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. Eles identificaram seis isolados, sendo cinco pertencentes a dois novos gêneros da família Xylariaceae (LGMF1126, LGMF1120, LGMF1123, LGMF1119 e LGMF1134) e um do gênero *Daldinia* sp. (LGMF 1131). Devido à alta atividade antifúngica observada para o isolado LGMF1131, e a ausência de dados para os outros 5 isolados pertencentes aos novos gêneros, o presente trabalho tem como objetivo ampliar o estudo de bioprospecção desses endófitos, avaliando sua citotoxicidade contra células tumorais e atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas humanas, aumentando assim o conhecimento sobre o potencial de microrganismos endofíticos provenientes da planta medicinal *V. divergens* do Pantanal Sul mato-grossense.

2 OBJETIVOS

Avaliar a atividade a atividade antibacteriana e citotóxica de extratos de cinco fungos endofíticos da família Xylariaceae e uma linhagem de *Daldinia* sp., isolados da planta medicinal *Vochysia divergens* e depositados na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Sendo o uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (MACIEL et al., 2002).

As plantas com eficácia comprovada são possíveis matérias-primas para medicamentos, devendo possuir garantia de qualidade, desde o cultivo. Nesta perspectiva entende-se que planta medicinal deve ser isenta de substâncias que poderiam influenciar na qualidade final do fitoterápico (RATES, 2001). Cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal e entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização mundial da Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001). Nos países industrializados, as plantas contribuem com mais de 7.000 compostos para indústria farmacêutica incluindo aqueles usados em drogas cardíacas, laxantes, agentes anticancerígenos, hormônios, contraceptivos, analgésicos, antibióticos, diuréticos, etc. (KAUL et al., 2012).

Cerca de 68% dos compostos antibacterianos e 34% dos produtos utilizados na terapia do câncer são de produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2007 apud KAUL et al., 2012). A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais pode constituir ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Porém, a prospecção química de metabólitos fúngicos, apresenta uma grande vantagem em relação às demais fontes devido ao fato de que microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Além do fato, de que endófitos acabam demonstrando capacidade para a produção de alguns fitoquímicos caracteristicamente originados da planta (TAN; ZOU, 2001). Vale ressaltar ainda que, das quase 300.000 espécies de plantas que existem na Terra, cada planta individualmente hospeda um ou

mais endófitos. Consequentemente, a oportunidade de encontrar novos e interessantes microrganismos endofíticos entre miríades de plantas em diferentes ambientes e ecossistemas (STROBEL; DAISY, 2003), como o Pantanal, é excelente.

Vochysia divergens Pohl (Cambará) (FIGURA 1) é uma planta medicinal comumente usada em medicina popular contra infecções e asma (HESS et al., 1995; GUARIM NETO, 2006). Ela está amplamente distribuída no Pantanal Norte, sendo uma espécie amazônica, considerada uma formação invasora nas áreas de solos argilosos, tolerando bem as inundações, formando o cambarazal (SILVA et al., 2000). Termo utilizado para definir um tipo vegetacional formado basicamente por indivíduos desta planta (SILVA et al., 2000). A bioprospecção de extratos de microrganismos endofíticos isolados de *V. divergens* obteve resultados antibacterianos, antifúngicos e citotóxicos contra células tumorais (GLIENKE et al., 2012; BIZ, 2014; SAVI et al., 2015; HOKAMA et al., 2017), demonstrando a importância de se explorar melhor endófitos desta planta.

FIGURA 1 – PLANTA *Vochysia divergens* Pohl (CAMBARÁ) INDICADA PELA SETA.



Fonte: GLIENKE (arquivo pessoal).

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos foram descobertos por Darnel, na Alemanha, em 1904 (TAN, 2001; STROBEL; DAISY, 2003), estes microrganismos vivem no interior das plantas, habitando geralmente, suas partes aéreas, sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (AZEVEDO; MELO; AZEVEDO, 1998; SCHULZ; BOYLE, 2005).

O endófito e a planta estabelecem uma estreita relação, e a ausência de patogenicidade pelo fungo depende da não ocorrência de alterações, ocasionadas quando o hospedeiro sofre algum tipo de stress ou em mudanças fisiológicas em alguns organismos envolvidos (ANDRADE, 2015). Portanto, a interação entre a planta hospedeira e seu endofítico caracteriza-se por um equilíbrio

finamente afinado entre a virulência fúngica e a defesa das plantas (SCHULZ et al., 2002). Quando há este equilíbrio, o endofítico, através da produção de compostos, pode diminuir a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferir resistência a fitopatógenos, além da produzir fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, entre outros (NETO, 2004).

Assim, o endófito necessita sintetizar metabólitos não somente para competir primeiro com fungos epifíticos (que vivem na superfície dos vegetais) e depois com agentes patogênicos para colonizar o hospedeiro, mas presumivelmente também para regular o metabolismo do hospedeiro nesta associação delicadamente equilibrada (SCHULZ et al., 2002).

Os fungos filamentosos, onde os endofíticos estão incluídos, constituem um grupo de microrganismos que biossintetizam uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando, em casos especiais, a uma produção 73% superior à de outras classes de microrganismos (DREYFUSS et al., 1994 citado por CAFÊU et al., 2005). Estima-se que exista cerca de 1.5 milhões de espécies de fungos, sendo que 100 000 estão descritas, implicando em somente 7% dos fungos do mundo descritos até 2004 (HAWKSWORT, 2004) e apenas alguns deles já foram cultivados e selecionados para a produção de drogas (SURYANARAYANAN et al., 2009).

A formação de novos composto bioativos é gerada muitas vezes por essa relação simbiótica devido a ocorrência de hibridização entre a planta e o fungo, que leva a variabilidade genética (SAIKKONEN et al., 1998). Entre esta associação planta-microrganismos, endofíticos acabam demonstrando capacidade para a produção de alguns fitoquímicos caracteristicamente originados da planta (TAN; ZOU, 2001). Esses fungos poderiam ainda ser alterados geneticamente passando a expressar genes de interesse, colaborando assim para aumentar os níveis de produtividade das plantas medicinais e de outras culturas de interesse estratégico (NETO, 2004).

Muitos compostos com atividade fungicida, bioinseticida, bioherbicida, anti-helmíntica, antibacteriana, antitumoral, imunossupressora (transplante de órgãos), reguladores de crescimento herbáceo, uterocontratora, etc., foram isolados de fungos endofíticos, demonstrando o potencial biotecnológico desses bioativos (DEMAIN, 2000).

3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabolitos secundários de microrganismos e plantas dobraram a expectativa de vida durante o século 20, reduzindo e erradicando os males de muitas doenças, além de revolucionarem a medicina (DEMAIN, 2002).

Produtos naturais de endófitos fúngicos têm um amplo espectro de atividades biológicas, e podem ser agrupadas em várias categorias, incluindo alcaloides, esteroides, terpenóides,

Isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides e ligninas, fenol, ácidos fenólicos, metabolitos alifáticos, lactonas, etc. (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Puri et al. (2005) isolaram o alcalóide Camptotecina (3) (C₂₀H₁₆N₂O₄), que exibe um mecanismo de ação exclusivo inibindo a enzima intranuclear topoisomerase I, que é necessária para a flexibilidade e o relaxamento do DNA durante eventos moleculares, como a replicação e a transcrição do DNA, de *Entrophospora infrofspora* endofítica de *Nothapodita foetida*. Para verificar a atividade biológica deste composto, realizou-se um teste citotóxico *in vitro* contra linhagens celulares de câncer humano, em comparação com o exemplo padrão, resultando em atividades comparáveis (PURI et al., 2005).

Deshmukh et al. (2009) obtiveram a partir de endófitos da planta medicinal indiana *Mimusops elengi*, o composto Ergoflavin (9) (C₃₀H₂₆O₁₄), um novo agente anti-inflamatório e anticancerígeno que mostrou inibição significativa da proliferação em células de câncer de pâncreas, renal e de pulmão, sugerindo que pode exercer os seus efeitos através de mecanismos semelhantes aos do ácido secalônico D (SAD) (DESHMUKH et al., 2009). Zhang et al. (2009) testaram os efeitos deste composto, o Ácido secalônico D (10) (C₃₂H₃₀O₁₄), uma micotoxina, isolada de um fungo endofítico de mangue, que exibiu uma boa atividade citotóxica em células HL60 e K562 induzindo a apoptose de células de leucemia (ZHANG et al., 2009).

A família Xylariaceae é considerada uma grande fonte de uma variedade de compostos bioativos, com muitas estruturas químicas variadas e atividade biológica. A investigação química dos fungos dessa família mostrou-se uma fonte potencial de produtos biotecnológicos, com propriedades farmacológicas, principalmente (DE CARVALHO RIBEIRO et al., 2012).

Na literatura há diversos relatos de fungos dessa família com um amplo espectro de ação: citotoxicidade contra células tumorais, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (DAFERNER et al., 1999; CAFÊU et al., 2005; LIU et al., 2008; MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011; LEE et al., 2012; LINH et al., 2014; KUHNERT, et al., 2015).

Isaka et al. (2010) isolaram o fungo *Xylaria* sp. e a partir de seu extrato obtiveram atividade antimalária, antituberculose, antifúngica, antibacteriana e citotóxica contra diversas linhagens tumorais. Healy et al. (2004) a partir de um fungo desse mesmo gênero, realizaram a caracterização química de seu extrato e isolaram dois compostos caracterizados como Xantonas, um classe de produtos naturais que têm mostrado propriedades farmacológicas antibacterianas (HEALY, et al., 2004), antitumorais (HO et al., 2002; PORNPAAKAKUL et al., 2006), antifúngicas (PINTO et al, 1994; GOPALAKRISHNAN et al., 1997; REYES-CHILPA, et al., 1997; DHARMARATNE et al, 2009), antioxidantes (LIN et al., 1996), etc.

Um estudo fitoquímico sobre o extrato de metanol do fungo vietnamita *Daldinia concentrica* obteve três compostos: 6-hydroxymellein, daldinialanone e ergosterol, e todos os três apresentaram moderada citotoxicidade contra quatro células de câncer, KB (carcinoma

epidérmico humano), MCF7 (carcinoma de mama humano), SK-LU-1 (carcinoma de pulmão humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) (QUANG, 2013). Outros trabalhos com esse fungo relataram extratos com ação antifúngica (LIARZI et al., 2016) e antioxidante (LEE et al., 2012).

Tais estudos demonstram a importância de mais estudos antibacterianos e de citotoxicidade contra células tumorais, utilizando metabolitos de microrganismos endofíticos. Pois, apenas uma pequena proporção de bactérias e fungos foram até agora examinados para a produção de metabolitos secundários (DEMAIN, 2002).

3.4 CITOTOXICIDADE E ENDÓFITOS

O primeiro agente quimioterapêutico foi descoberto por acidente há mais de cinquenta anos. O gás de mostarda (1,5-dicloro-3-tiapentano) foi usado como agente de guerra química durante a I Guerra Mundial e foi estudado ainda mais durante a II Guerra Mundial. Durante uma operação militar na II Guerra Mundial, um grupo de pessoas foram acidentalmente expostas ao gás de mostarda, e mais tarde encontraram contagens muito baixas de glóbulos brancos. Os cientistas argumentaram que um agente que danificava os glóbulos brancos em rápido crescimento poderia ter um efeito semelhante em certos tipos de câncer de sangue. Na década de 1940, vários pacientes com linfomas avançados receberam o medicamento pela veia, em vez de respirar o gás irritante. A sua melhoria, embora temporária, foi notável. Esta experiência levou os pesquisadores a procurar outras substâncias que possam ter efeitos semelhantes contra o câncer (KHARWAR et al., 2011; GOODMAN et al., 1946 citado por KHARWAR et al., 2011).

Muitos dos quimioterápicos anticancerígenos amplamente prescritos hoje são agentes citotóxicos. Esses compostos são projetados para matar células cancerosas de forma mais efetiva do que as células normais, porque eles geralmente visam as células de câncer, que são mais rapidamente divididas. No entanto, nem sempre é esse o caso. Algumas células como a medula óssea, os folículos pilosos e as células epiteliais, também se dividem rapidamente e são frequentemente alvo de efeitos colaterais que podem variar de desagradável a seriamente debilitante. Apesar dos problemas associados ao uso de agentes citotóxicos, os ensaios de citotoxicidade usando uma ampla gama de tipos de células cancerígenas têm desempenhado um papel importante na descoberta de compostos como o paclitaxel, a camptotecina e os alcaloides da vinca que visam células cancerosas (KHARWAR et al., 2011).

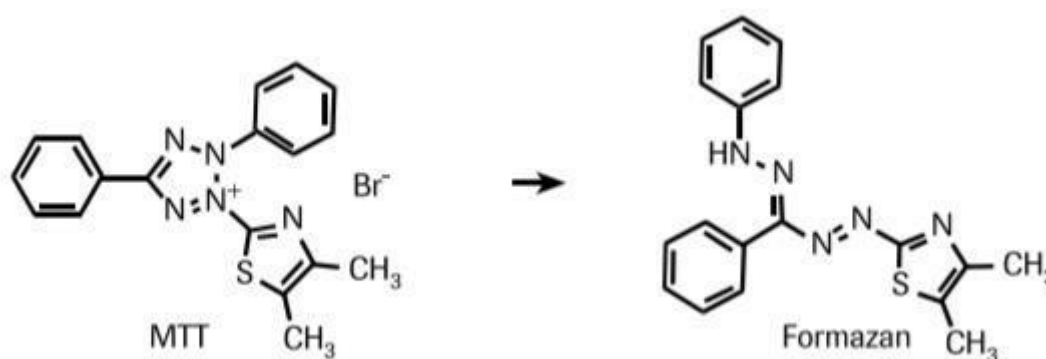
O câncer se caracteriza como um grupo de doenças que podem afetar vários órgãos do corpo e é caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais e invasão em tecido normal. As células cancerosas também podem se espalhar para outras partes do corpo, produzindo novos tumores, e se a disseminação das células se tornar incontrolável, isso pode levar à morte (KHARWAR et al., 2011).

Os fungos endofíticos têm sido bem estudados como uma fonte de agentes anticancerígenos desde a descoberta do Taxol (KAUL et al., 2012). O taxol é produzido por diversos fungos endofíticos, porém teve sua descoberta a partir da casca da árvore *Taxus breyifolia*. Ele é amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama, ovário, próstata, pulmão e adenocarcinoma (PARK et al., 2004; HENLEY et al., 2007; TAN; YU, 2007). As propriedades antitumorais deste composto estão correlacionadas com a ligação e estabilização dos microtúbulos, bloqueando assim, a replicação celular na fase G2-M do ciclo celular (FAUZEE, 2011). Outros importantes anticancerígenos são a Vincristina, isolada da planta *Catharanthus roseus* (SVOBODA; BLAKE, 1975), e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* (KUMAR et al., 2013) obtido da mesma planta, e a Camptotecina, inicialmente isolada da madeira de *Camptotheca acuminata* (WALL, et al., 1996), pode agora ser isolada do fungo endofítico *Fusarium solani* que está associado à planta (KUSARI; ZÜHLKE; SPITELLER, 2009).

Relatos destes anticancerígenos, inicialmente isolado de uma árvore, e em seguida, de endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser melhor explorado (KHARWAR et al., 2011; SAVI, 2012).

Uma forma de avaliar a citotoxicidade dos extratos é utilizando a técnica de MTT. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídios usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (VITRAL et al., 2008) (FIGURA 2).

FIGURA 2- ESQUEMA DEMONSTRANDO A TRANSFORMAÇÃO DO SAL MTT EM SAL FORMAZAN



Fonte: Sigma Aldrich, 2017.

3.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A ação seletiva exercida sobre bactérias patogênicas e fungos, por metabólitos secundários de microrganismos, inaugurou a era dos antibióticos e, durante muitos anos, estamos nos beneficiamos dessa notável propriedade das "drogas maravilhosas" (DEMAIN, 2002).

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003 citado por GUIMARÃES et al., 2010).

O primeiro metabólito fúngico com ação antibacteriana, de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta, também acidentalmente, por Fleming, em 1928 (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). O uso extensivo de penicilina em meados dos anos 50, após a Segunda Guerra Mundial (OLIVEIRA; SILVA, 2008; SILVERMAN; HOLLADAY, 2014), desencadeou o surgimento das primeiras cepas de bactérias Gram-positivas não susceptíveis a antibióticos penicilínicos, conhecidos como PRSP ("penicillin-resistant" *Streptococcus pneumoniae*) (SILVEIRA et al., 2006). Com o aparecimento da resistência bacteriana começou a corrida pela busca de novas substâncias que suprissem a resistências a alguns antibióticos (PAZIAN; DA SILVA SASS, 2007).

A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias mudam em resposta ao uso desses medicamentos, resultando em maiores custos médicos, internações hospitalares prolongadas e aumento da mortalidade. Novos mecanismos de resistência emergem e se espalham globalmente todos os dias, ameaçando a nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns (PINHEIRO et al, 2017). A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma consequência natural da habilidade da população bacteriana de se adaptar. O uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade de a bactéria ser exposta aos mesmos. Aquela oportunidade facilita a aquisição de mecanismos de resistência (SANTOS DE QUEIROZ, 2004).

Porém, algumas medidas podem ser tomadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana: prevenção de infecções bacterianas pelo uso de vacinas; uso prudente de antibióticos; controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes e a descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (MOELLERING JR, 1998).

Muitas das bactérias testadas neste estudo, são conhecidas pela sua resistência a antibióticos. Como a *Acinetobacter baumannii*, a espécie do gênero *Acinetobacter* que está mais comumente envolvida em infecções hospitalares, sendo reconhecida como um dos bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos mais difíceis de controlar e tratar, causando uma

ampla gama de infecções, incluindo pneumonia e infecções sanguíneas (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; ELIOPOULOS; MARAGAKIS; PERL, 2008). Além disso, várias bactérias apresentam habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos, destacando-se as gram-negativas Enterobacteriaceae. Nesta família de microrganismos, a produção de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) é um mecanismo emergente, o que justifica sua vigilância constante (DIENSTMANN, et al., 2010). Não se pode deixar de citar também a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), uma bactéria gram-positiva que é uma das principais causas de infecções adquiridas em hospitais que está se tornando cada vez mais difícil de combater por causa da resistência emergente à todas as classes atuais de antibióticos (ENRIGHT et al, 2002).

Este ano, a OMS publicou sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos, nessa lista constam 12 famílias de bactérias que necessitam urgentemente do desenvolvimento de novos antibióticos para combatê-las (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). E de acordo com Fleck et al. (1999 citado por SAVI, 2012), a OMS estimou que para a descoberta de um novo antibiótico, para combater bactérias multirresistentes leva um tempo de 10 anos a um custo de R\$ 1,88 bilhão. Portanto, nota-se que é necessária uma busca incessante por novos compostos com capacidade antimicrobiana, visto que o surgimento de novas bactéria super-resistentes está aumentando, e que o tempo para a descoberta de compostos com potencial, é relativamente elevado

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Fungos de cinco linhagens de dois novos gêneros pertencente à família Xylariaceae (LGMF1126, LGMF1120, LGMF1123, LGMF1119 e LGMF1134) e um de *Daldinia* sp. (LGMF1131), selecionados devido ao potencial antifúngico de seus metabólitos secundários verificados previamente pelo grupo de pesquisa LabGeM (HOKAMA et al., 2017).

4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS

Para a obtenção dos metabólitos secundários, os fungos foram cultivados por 7 dias em placas de petri com meio BDA e em seguida, três discos de micélio de 8 mm foram inoculados em erlenmeyers (500 mL) contendo 250 mL dos meios de cultura M1D, BD, ME e Czapek (TABELA 1), permanecendo sob agitação por 21 dias (24°C e 180 rpm), totalizando 24 erlenmeyers. Após a fermentação, o micélio foi separado do líquido fermentado por filtração através de filtros de papel Whatman nº4. Os metabólitos foram extraídos utilizando o solvente acetato de etila (3 x v), que foi posteriormente evaporado em rotaevaporador a 45°C. O extrato seco foi diluído em DMSO na concentração de 500, 50 e 5 µg/mL, para os testes de citotoxicidade contra células tumorais, e em metanol, a 10mg/mL, 1mg/mL e 0,5 mg/mL para o teste contra patógenos clínicos. Para os testes tumorais foram utilizados somente os fungos cultivados em meio M1D, devido sua eficácia em estimular a produção de compostos com atividade tumoral comprovada (STROBEL et al., 1996; KUMARAN et al., 2008; SENTHIL et al., 2008; KUMARAN et al. 2009).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA FERMENTAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Meios de cultura	Componentes de meio de cultura (1L)	pH
BD	batata 200 g e dextrose 15 g.	5.8
Czapek	glucose 20 g/L; NaNO ₃ 2 g/L; K ₂ HPO ₄ 1 g/L; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L; KCl 0.5 g/L, FeSO ₄ 0.01 g/L e extrato de levedura 0.5 g/L.	8.5
ME	extrato de malte 20g/L, glicose 20g/L e peptona 1g/L	6.2
M1D	Ca(NO ₃) ₂ , 1.2 mM; KNO ₃ , 0.79 mM; KCl, 0.87 mM; MgSO ₄ , 3.0 mM; NaH ₂ PO ₄ , 0.4 mM; sucrose, 87.6 mM; Ammonium tartarate 27.1 mM; FeCl ₃ , 7.4, µM; MnSO ₄ , 30, µM; ZnSO ₄ , 8.7, µM; H ₃ BO ₃ , 22, µM; KI, 4.5 mM, Inositol (5g/L); Tiamina (0.5 gl ⁻¹); Biotina (0.5 gl/L) e água de coco (12 ml/L).	5.5

FONTE: O Autor (2017).

4.3 TESTES DOS EXTRATOS

4.3.1 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

A avaliação citotóxica dos extratos foi realizada utilizando a técnica de MTT, frente a células de Melanoma B16F10 conforme descrito por Vitral et al. (2008). As células foram mantidas a 37°C a 5% de CO₂ (Incubadora CO₂, Thermo Scientific®, EUA), em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células cresceram com confluência próxima de 70% em garrafas plásticas e foram sub-cultivadas semanalmente com 10% de tripsina. Elas foram contadas em câmara de Neubauer e cultivadas com densidade inicial de 2,5x10³/mL nos experimentos.

4.3.2 CITOTOXICIDADE CONTRA CÉLULAS TUMORAIS

A avaliação citotóxica dos extratos foi realizada utilizando a técnica de MTT, frente a células de Melanoma B16F10, que foram semeadas em microplaca com 200 µL de meio DMEM-glucose suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). Após 24 horas de cultivo, elas foram tratadas com 2 µL de extratos, diluídos em DMSO (0,1%), em duas concentrações: 5 µg/mL e 50 mg/mL. As placas foram mantidas por 21 e 45 horas a 37°C. Após a incubação foi adicionado 200 µg/mL de MTT em PBS (concentração final de 0,5 mg/mL) e incubados por 3 horas. Como controle foi utilizado DMSO (solvente). Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionados 200 µL/poço de DMSO. A placa permaneceu sob agitação por 20 minutos. Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica em 550 nm. O índice de proliferação celular foi calculado pela razão entre a absorbância das células controles e as tratadas com os extratos. A concentração inibitória em 50% (IC₅₀) foi calculada utilizando o Software *GraphPad Prism 7*.

4.3.2 TESTE CONTRA PATÓGENOS CLÍNICOS

Os patógenos clínicos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase).

Para testar o potencial antibacteriano dos extratos, cada patógeno foi inoculado em caldo TSB e cultivado de 10 a 12h em agitador a 37°C, 180 rpm. Após o cultivo, foi diluída uma alíquota conforme escala de McFarland nº0,5 e com o auxílio de swab os patógenos foram inoculados em placa de ágar Muller Hinton, o processo de espalhamento foi realizado 3 vezes a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo, e como passo final, passou-se o swab na margem

da placa (FERRARO et al., 2003). Sobre estas placas foram posicionados seis discos de papel filtro com 6mm de diâmetro, e com auxílio de uma pipeta, 10µL de extrato foi transferido para os discos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Como controles foram utilizados discos com antibiótico de ação contra a bactéria testada (TABELA 2) e metanol (solvente de diluição do extrato). Os testes foram feitos em triplicatas. Após a incubação, foi avaliada a formação de halo, comparando o tratamento com os controles (SAVI et al., 2015 e CLSI, 2015). Os valores dos halos nos tratamentos que se apresentarem maiores que os dos controles, serão considerados inibidores.

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco (FERRARO et al., 2003).

TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS CONTRA OS PATÓGENOS SUBMETIDOS AOS TESTES DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS.

Bactéria	Antibiótico	Concentração (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Oxaciclina	6
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	Oxaciclina	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vancomicina	30
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meropenen	10

FONTE: O Autor (2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE EXTRATOS

Um total de 24 extratos foram produzidos a partir dos seis isolados endofíticos nos meios de cultura BD, Czapek, ME e M1D. Quanto ao rendimento dos extratos produzidos, houve elevada variação entre os isolados e os meios de cultura, sendo o meio ME o que apresentou o maior rendimento (TABELA 3).

TABELA 3 - PESOS SECOS DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DOS SEIS ISOLADOS ENDOFÍTICOS NOS MEIOS DE CULTURA BD, CZAPEK (CZ), ME E M1D.

Extrato		Rendimento dos extratos (mg)			
Isolados	Código	BD	CZ	ME	M1D
Xylariaceae sp.1	LGMF1119	60	20	105	15
Xylariaceae sp.1	LGMF1120	18	27	20	9
Xylariaceae sp.1	LGMF1123	55	100	49	13
Xylariaceae sp.1	LGMF1126	24	31	44	22
<i>Daldinia</i> sp.	LGMF1131	63	92	126	89
Xylariaceae sp.2	LGMF1134	95	83	100	23

FONTE: O Autor (2017).

5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Dos seis extratos produzidos em meio M1D, analisados frente a linhagem celular B16F10, o extrato proveniente do fungo *Xylariaceae* sp.1 LGMF1123 foi o que obteve melhores resultados com 14,3% de viabilidade celular (48h) (FIGURA 3) e IC₅₀ de 11,6 µg/mL (24h) e 6,798 µg/mL (48h) (TABELA 4), revelando seu potencial citotóxico para essa linhagem celular. Também é possível notar que não há grandes diferenças entre os dois tempos utilizados (24 e 48h), excetuando os extratos LGMF1126 e LGMF1134, que apresentaram mais que o dobro no valor de IC₅₀ e de viabilidade celular (%) em 24h em relação a 48h.

Inúmeros trabalhos utilizaram a mesma linhagem celular para seus ensaios, como Bogo et al. (2010), que testaram a atividade de diversos compostos derivados do ácido lecanórico (um metabólito secundário do líquen *Parmotrema tinctorum*, isolado de uma planta do Pantanal), sendo o n-butil orselinato o composto com maior ação, obtendo um valor de IC₅₀ = 11.4 µg/mL. Guimarães et al. (2007) também utilizaram a mesma linhagem de células, e testaram o composto nectriapyrone, isolado do fungo *Glomerella cingulata*, e obtiveram o valor de IC₅₀ = 1463 µg/mL, sendo o maior valor entre as células testadas. Testes contra outras linhagens celulares tumorais, utilizando compostos originários de fungos da família *Xylariaceae*, mostraram-se promissores,

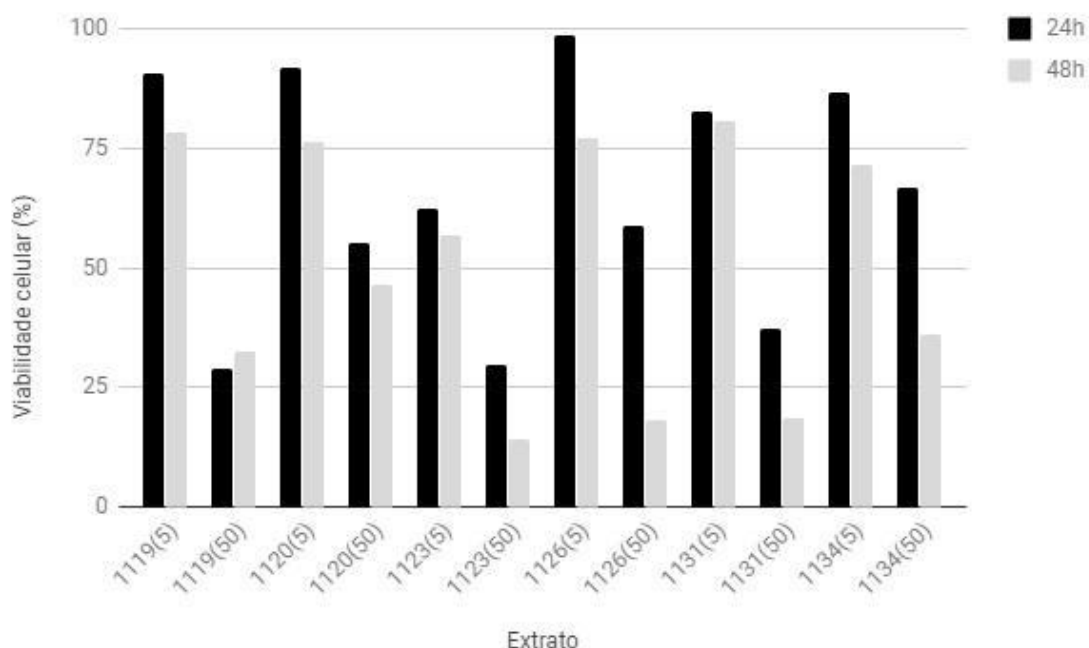
como a Cytochalasin D, isolada do fungo *Xylaria* sp., que possui ação contra mais de oito linhagens celulares (PONGCHAROEN et al., 2007; WEI, et al., 2015; MACÍAS-RUBALCAVA et al., 2017). Brissow et al. (2017) também utilizaram uma cytochalasin (18-des-hydroxy cytochalasin H) obtida do fungo *Diaporthe phaseolorum*-92C, isolado de uma planta do pantanal, contra duas linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, obtendo os valores de IC₅₀ = 17.5 e 8.88 µg/mL, respectivamente. Tarman et al. (2011) isolaram o fungo *Xylaria psidii* de uma alga vermelha marinha (*Kappaphycus alvarezii*), e seus extratos apresentaram atividade citotóxica contra uma linhagem celular de carcinoma urinário da bexiga com valores de IC₅₀ de 4µg/ml. Também utilizando endofíticos de *Vochysia divergens*, Savi et al. (2015) obtiveram valores de IC₅₀ que indicam alta atividade do composto isolado, porém contra as linhagens celulares PC3 e A549.

TABELA 4- IC₅₀ DOS EXTRATOS PRODUZIDOS COM MEIO M1D, FRENTE AS CÉLULAS DA LINHAGEM DE MELANOMA B16F10, EM 24h E 48h.

Isolados	Extrato	IC ₅₀ (µg/mL)	
		24h	48h
Xylariaceae sp.1	LGMF1119	25,27	21,64
Xylariaceae sp.1	LGMF 1120	61,55	38,95
Xylariaceae sp.1	LGMF 1123	11,6	6,798
Xylariaceae sp.1	LGMF 1126	61,97	14
<i>Daldinia</i> sp.	LGMF 1131	28,29	15,51
Xylariaceae sp.2	LGMF 1134	193,3	20,7

FONTE: O Autor (2017).

FIGURA 3 – GRÁFICO REPRESENTANDO A VIABILIDADE CELULAR (%) DAS CÉLULAS DE MELANOMA DA LINHAGEM B16F10, FRENTE AOS EXTRATOS TESTADOS (M1D), NAS CONCENTRAÇÕES DE 5 E 50 µg/mL EM 24 E 48h.



FONTE: O Autor (2017).

5.3 ATIVIDADE MICROBIANA

Nos testes contra os patógenos clínicos, pode ser observado na TABELA 5 e na FIGURA 4, que houve grande variação no tamanho do halo de inibição formado. Um exemplo pode ser observado na FIGURA 5. É possível notar que *K. pneumoniae* e *S. aureus* (MRSA) se mostraram susceptíveis a todos os extratos na concentração de 10µg/mL, com destaque para o extrato produzido pela linhagem LGMF1120 em meio M1D e linhagem LGMF1131 em meio BD, respectivamente. Apesar da grande importância clínica e dificuldade no tratamento, *A. baumannii* apresentou maior susceptibilidade aos extratos avaliados, com destaque para extratos produzidos pelo cultivo da linhagem LGMF1120 em meio ME e a linhagem LGMF1120 em meio Czapeck.

Este resultado se mostra importante já que *A. baumannii* surgiu como um dos mais problemáticos microrganismos para instituições de saúde globalmente, sendo o um dos patógenos nosocomiais mais importantes (DIJKSHOORN et al., 2007; PELEG et al., 2008). Sua relevância clínica foi impulsionada pela sua notável habilidade de se adaptar ou adquirir determinantes de resistência, tornando-se um dos organismos que ameaçam a atual era de antibióticos. Já foram relatadas cepas de *A. baumannii* resistentes a todos os antibióticos

conhecidos, significando um estado de alerta que deve ser tomado prontamente pela comunidade internacional de saúde (PELEG et al., 2008).

Já *S. aureus* (MSSA) se mostrou uma das menos susceptíveis, já que apenas um dos extratos (LGMF11341 no meio M1D) apresentou atividade. Sendo, juntamente com MRSA, as bactérias que mais apresentaram resistência aos extratos. Em vista dessa variação de extrato para cada bactéria, nota-se que a linhagem analisada e o meio utilizado para a fermentação fúngica são condições que influenciam na produção de metabólitos secundários ativos distintos, como já descrito na literatura (SAMŠINÁKOVÁ, 1996; ONOFRE et al., 2001; TONIAL et al., 2016; GOS et al., 2017). Os extratos que apresentaram em geral maior atividade, são os obtidos a partir de linhagens de *Xylariaceae* sp.1. É fundamental a identificação desses isolados em nível de espécie, em trabalhos futuros.

O controle destes microrganismos é de suma importância, como já dito anteriormente, razão pela qual muitos trabalhos de bioprospecção os têm como alvo. Liu et al. (2008) isolaram o composto 7-amino-4-metilcumarina de *Xylaria* sp., que inibiu o crescimento dos 13 microrganismos testados, incluindo *Staphylococcus aureus*, mostrando uma potente atividade antimicrobiana. Nascimento et al. (2000) utilizaram extratos de 10 plantas contra 14 microrganismos resistentes, incluindo *K. pneumoniae* e *S. aureus*, que se mostraram suscetíveis a 4 e 1 extratos, respectivamente. Neste trabalho também foi testado o efeito sinérgico da associação de antibióticos com os extratos das plantas contra as bactérias resistentes, e um resultado positivo foi obtido contra a maioria delas (NASCIMENTO et al., 2000).

Gos et al. (2017) obtiveram ótimos resultados de inibição bacteriana contra *Staphylococcus aureus* (22 mm) e MRSA (19.8 mm), e resultados similares ao do presente trabalho contra *A. baumannii* (13.5 mm), utilizando o extrato proveniente de *Aeromicrobium ponti* LGMB941, um actinomiceto isolado da planta *V. divergens*. O extrato dessa planta também exibe potencial antimicrobiano. Hess et al. (1995) verificaram que o seu extrato de etanol apresenta atividade bactericida contra *S. aureus*. Porém, ao contrário do trabalho de Goes et al. (2017), no presente trabalho nota-se que extratos apresentaram maior atividade frente as duas estirpes gram-negativas (*A. baumannii* e *K. pneumoniae*). Essas bactérias possuem lipopolissacarídeos que estão localizados na parte externa da membrana celular, sendo os responsáveis pela capacidade patogénica destes microrganismos (MOLLINEDO PATZI; GONZÁLES VILLALOBOS, 2014). Em trabalhos em que mais de um extrato é testado, seja por diferença de potencial metabólico do microrganismo ou planta que o gerou, ou por diferentes condições de cultivo, é observado que há uma distinção no grau de inibição contra bactérias gram-positivas ou negativas (SRINIVASAN et al., 2001; WALSH et al., 2003; USHIMARU et al., 2007; EFSTRATIOU et al., 2012; TONIAL et al., 2016).

Ao comparar dados obtidos em diferentes estudos, a maioria das publicações fornecem generalizações sobre se um óleo vegetal ou extrato possui atividade contra bactérias gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, nem todos fornecem detalhes sobre a extensão ou o espectro desta atividade (HAMMER et al., 1999).

Apesar do interesse econômico e do seu intenso uso na medicina popular, há poucos relatos sobre a composição química e a atividade biológica da planta *Vochysia divergens* (GLIENKE, 2012). Portanto, os resultados obtidos por esses compostos são de suma importância, pois além de corroborarem com a literatura, eles se mostraram, em muitos casos, mais promissores. Contribuindo assim, para evidenciar o potencial em produzir compostos bioativos de endofíticos dessa planta, como os da família Xylariaceae, e de outras provenientes do Pantanal. Sendo necessária uma investigação mais detalhada acerca dos metabólitos secundários produzidos pelos endófitos desta e de outras plantas pantaneiras, promissoras no que se referem a elucidação de novos compostos importantes para a saúde pública.

TABELA 5 – TAMANHO MÉDIO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) COM O DESVIO PADRÃO DOS 24 EXTRATOS, EM TRÊS CONCENTRAÇÕES, CONTRA AS BACTÉRIAS: *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* (MSSA) e *Acinetobacter baumannii*.

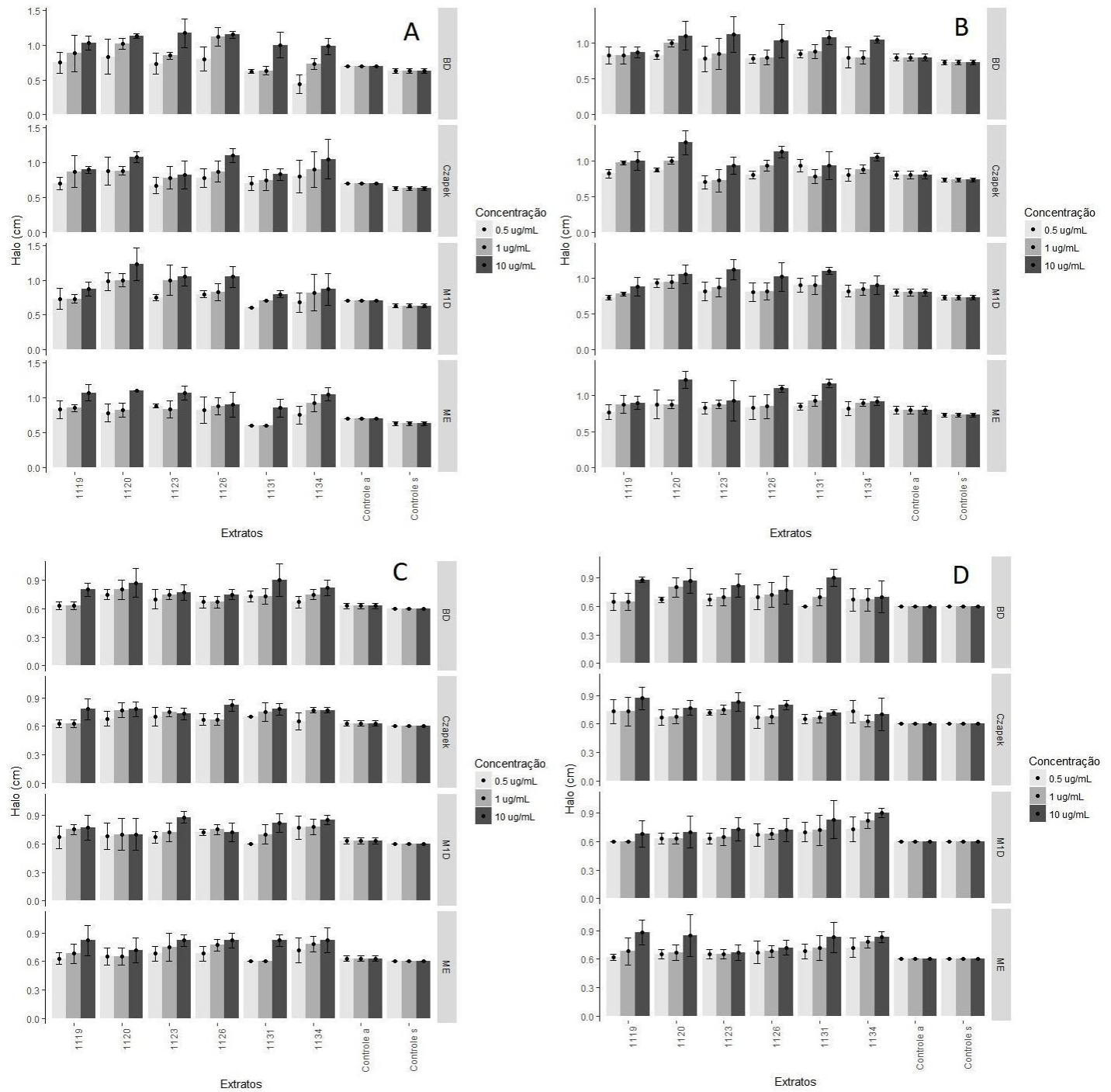
Zona de inibição (mm)												
Extratos	KPC			MRSA			S. aureus			A. baumannii		
	0,5 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL
1119BD	7.5± 1.5	8.8± 2.6	10.3± 1	6.3± 0.4	6.3± 0.4	8± 0.7	6.5± 0.9	6.5± 0.9	8.8± 0.3	8.3± 1.2	8.3± 1.2	8.6± 0.8
1119CZ	7± 0.9	8.6± 2.3	9± 0.5	6.3± 0.4	6.3± 0.4	7.8± 1.1	7.3± 1.3	7.3± 1.5	8.7± 1.2	8.2± 0.6	9.6± 0.3	1± 1.3
1119ME	8.5± 1.3	8.2± 0.5	10.6± 1.2	6.3± 0.6	6.8± 1	8.2± 1.6	6.2± 0.3	6.8± 1.4	8.8± 1.3	7.6± 1	8.8± 1.2	9± 0.9
1119MID	7.3± 1.5	7± 0.6	8.6± 1	6.6± 1.2	7.5± 0.5	7.6± 1.3	6± 0	6± 0	6.8± 1.4	7.3± 0.3	7.8± 0.3	8.8± 1.3
1120BD	8.3± 0.25	10.2± 0.8	11.3± 0.3	7.5± 0.5	8± 1	8.6± 1.5	6.7± 0.3	8± 1	8.7± 1.3	8.3± 0.6	10± 0.5	11± 2
1120CZ	9.6± 8.8	8± 0.6	10.8± 0.8	6.8± 0.8	7.6± 0.8	7.8± 0.8	6.7± 0.8	6.8± 0.8	7.7± 0.8	8.6± 0.3	10± 0.5	12.5± 1.7
1120ME	7.8± 1.3	8.2± 1	11± 0	6.5± 0.9	6.5± 0.9	7.2± 1.3	6.5± 0.5	6.7± 0.8	8.5± 2.2	8.8± 2	8.8± 0.6	12.2± 1.2
1120MID	10.8± 1.3	9.6± 0.9	12.3± 2.3	6.8± 1.4	7± 1.7	7± 1.7	6.3± 0.6	6.3± 0.6	7± 1.7	9.3± 0.6	9.5± 0.9	10.5± 1.3
1123BD	7.3± 1.5	8.5± 0.5	11.7± 2.1	7± 1	7.5± 0.5	7.6± 0.8	6.7± 0.6	7± 0.9	8.2± 1.2	7.8± 1.8	8.5± 2.2	11.2± 2.5
1123CZ	6.6± 1.2	7.8± 1.6	8.2± 2	7± 1	7.5± 0.5	7.3± 0.6	7.2± 0.3	7.5± 0.5	8.3± 1	7± 0.9	7.2± 1.6	9.3± 1.2
1123ME	8.8± 0.3	7.8± 1.2	10.6± 1	6.8± 0.6	7.5± 1.5	8.2± 0.6	6.5± 0.5	6.5± 0.5	6.7± 0.8	8.3± 0.8	8.8± 0.6	9.3± 2.8
1123MID	7.5± 0.5	10± 2.2	10.5± 1.3	6.6± 0.6	7.2± 1	8.8± 0.6	6.3± 0.6	6.5± 0.9	7.3± 1.2	8.2± 1.3	8.6± 1.3	11.2± 1.4
1126BD	8± 1.7	11.2± 1.3	11.5± 0.5	6.6± 0.6	6.6± 0.6	7.5± 0.5	7± 1.3	7.2± 1.3	7.7± 1.5	7.8± 0.6	8± 1	10.3± 2.3
1126CZ	7.8± 1.3	8.6± 1.5	11± 1	6.6± 6	6.6± 0.6	8.2± 0.6	6.7± 1.2	6.8± 0.8	8± 0.5	8± 0.5	9.3± 0.8	11.2± 0.8
1126ME	8.2± 1.9	8.8± 1.2	9± 1.8	6.8± 0.8	7.6± 0.6	8.2± 0.8	6.7± 1.2	6.8± 0.6	7.2± 0.8	8.3± 1.6	8.5± 1.7	11± 0.5
1126MID	8± 0.5	8.3± 1.2	10.5± 1.5	7.1± 0.3	7.5± 0.5	7.2± 1	6.7± 1.2	6.8± 0.6	7.2± 1.2	8± 1.3	8.2± 1.2	10.2± 2
1131BD	6.2± 0.3	6.3± 0.6	10± 1.8	7.3± 0.6	7.3± 0.8	9± 1.7	6± 0	7± 0.9	9± 0.9	8.5± 0.5	8.8± 1	10.8± 1

1131CZ	7± 1	7.5± 1.5	<u>8.3±</u> <u>0.8</u>	<u>7±</u> <u>0</u>	7.5± 1	<u>7.8±</u> <u>0.6</u>	6.5± 0.5	6.7± 0.6	7.2± 0.3	<u>9.3±</u> <u>0.9</u>	<u>7.8±</u> <u>1</u>	<u>9.3±</u> <u>1.9</u>
1131ME	6± 0	6± 0	<u>8.5±</u> <u>1.3</u>	6± 0	6± 0	<u>8.2±</u> <u>0.6</u>	6.8± 0.8	7.2± 1.3	8.3± 1.6	<u>8.5±</u> <u>0.5</u>	<u>9.3±</u> <u>0.8</u>	<u>11.6±</u> <u>0.6</u>
1131MID	6± 0	7± 0	<u>8±</u> <u>0.5</u>	6± 0	7± 1	<u>8.2±</u> <u>1</u>	7± 1	7.2± 1.6	8.3± 2	<u>9±</u> <u>1</u>	<u>9±</u> <u>1.3</u>	<u>11±</u> <u>0.5</u>
1134BD	4.4± 1.3	7.3± 0.8	<u>9.8±</u> <u>1.2</u>	6.6± 0.6	<u>7.5±</u> <u>0.5</u>	<u>8.2±</u> <u>0.8</u>	6.7± 1.2	6.7± 1.2	7± 1.7	<u>8±</u> <u>1.5</u>	<u>8±</u> <u>0.9</u>	<u>10.5±</u> <u>0.5</u>
1134CZ	8± 2.3	9± 2.6	<u>10.5±</u> <u>2.8</u>	6.5± 0.9	<u>7.6±</u> <u>0.3</u>	<u>7.6±</u> <u>0.3</u>	7.3± 1.2	6.3± 0.6	7± 1.7	<u>8±</u> <u>0.9</u>	<u>8.8±</u> <u>0.6</u>	<u>10.5±</u> <u>0.5</u>
1134ME	7.5± 1.3	<u>9.2±</u> <u>1.2</u>	<u>10.5±</u> <u>0.9</u>	7.2± 1.3	<u>7.8±</u> <u>0.8</u>	<u>8.2±</u> <u>1.3</u>	7.2± 1	7.8± 0.6	8.3± 0.6	<u>8.2±</u> <u>1</u>	<u>9±</u> <u>0.5</u>	<u>9.2±</u> <u>0.6</u>
1134MID	6.8± 1.4	8.2± 2.6	<u>8.6±</u> <u>2.3</u>	7.6± 1.2	<u>7.8±</u> <u>0.8</u>	<u>8.5±</u> <u>0.5</u>	7.3± 1.3	8.2± 0.8	9± 0.4	<u>8.2±</u> <u>0.8</u>	<u>8.5±</u> <u>0.9</u>	<u>9±</u> <u>1.3</u>
Controle A	6.3±0.3			6±0			8±0.5			6±0		
Controle S	7±0			6.3±0.3			7.3±0.3			6±0		

FONTE: O Autor (2017).

NOTA: Média das três repetições (± desvio padrão). Os melhores valores para cada patógeno estão em negrito e os extratos que tiveram atividade (> halo dos controles) estão sublinhados.

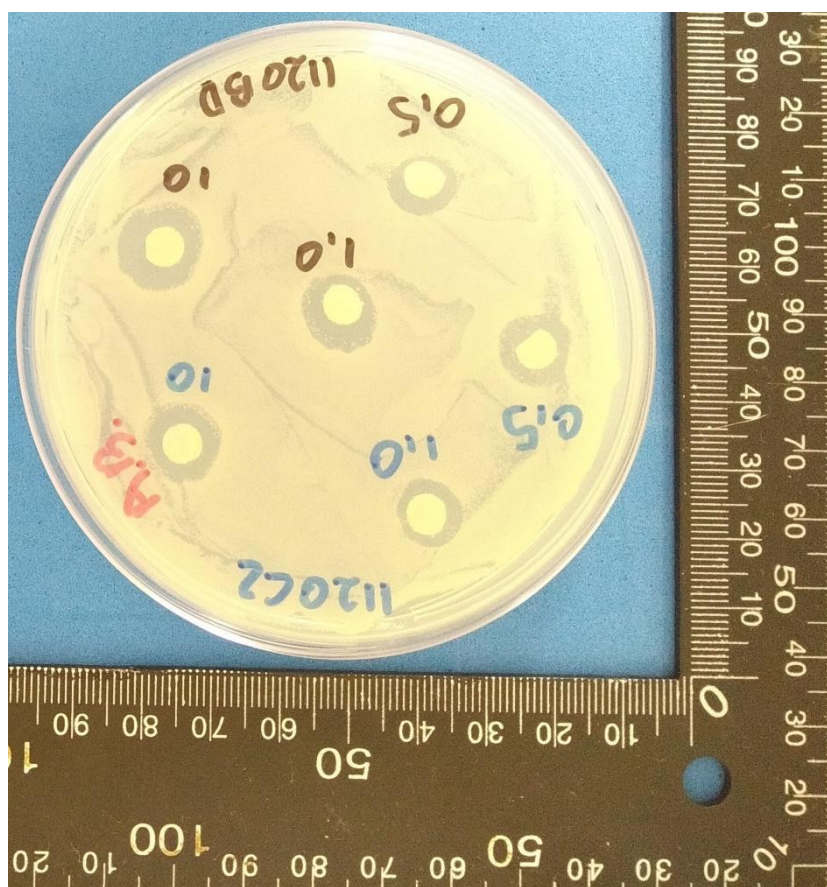
FIGURA 4 – GRÁFICOS DE BARRAS REPRESENTANDO AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO NAS TRÊS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS BD, CZAPEK, ME E M1D, CONTRA OS PATÓGENOS *K. pneumoniae* (A), *A. baumannii* (B), *S. aureus* (MRSA) (C) e *S. aureus* (MSSA) (D).



FONTE: RODRIGO ALUÍZIO (2017) com dados do autor.

NOTA: Controle A (antibiótico) e Controle S (solvente).

FIGURA 5 – PLACA MOSTRANDO O TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO DE *A. baumannii* FRENTE AOS EXTRATOS 11120 CZAPEK E 1120 BD NAS TRÊS CONCENTRAÇÕES.



FONTE: O Autor (2017).

REFERÊNCIAS

- ARIEIRA, J.; CUNHA, C. N. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 569-580, 2006.
- ANDRADE, H. F. **Caracterização molecular de fungos da Micoteca/UFPE e screening da produção de taxol**. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.
- BIZ, A. R. **Comunidade de fungos endofíticos coabitando raízes de espécies vegetais em área úmida e sua atividade microbiana**. 79f. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical) - Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2014.
- BOGO D.; MATOS, M. D. F. C.; HONDA, N. K. et al. In vitro antitumour activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 65(1-2), 43-48, 2010.
- BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.
- CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, p. 991-995, 2005.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** ; Twenty- Fifth Informational Supplement. Approved Standard M100-S25. NCCLS, Wayne, PA, 2015.
- DAFERNER, M.; MENSCH, S. ANKE, T. et al. Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 54c, 474–480, 1999.
- DE CARVALHO RIBEIRO, F. P.; FONSECA, F. C. S.; REIS, I. A. et al. Xylariaceae Endophytic Fungi Metabolites Against Salmonella. In *Salmonella-A Diversified Superbug*. **InTech**, 2012.

- DEMAIN, A. L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 331-331, 2002.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.
- DESHMUKH, S. K.; MISHRA, P. D.; KULKARNI-ALMEIDA, A. et al. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009.
- DHARMARATNE, H. R. W.; NAPAGODA, M. T.; TENNAKOON, S. B. Xanthonenes from roots of *Calophyllum thwaitesii* and their bioactivity. **Natural product research**, v. 23, n. 6, p. 539-545, 2009.
- DIENSTMANN, R., PICOLI, S. U., MEYER, G. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46(1), 23-27, 2010.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939-951, 2007.
- DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H.; GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential: biotechnology**. 1994.
- FAUZEE, N.J. Taxanes: promising anti-cancer drugs. **Asian Pacifica Journal of Cancer Preview**. 12, 837-851, 2011.
- EFSTRATIOU, E.; HUSSAIN, A. I.; NIGAM, P. S. et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, 18(3), 173-176, 2012.
- ELIOPOULOS, G. M.; MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254-1263, 2008.

ENRIGHT, M. C., ROBBINSON, D. A., RANDLE, G. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(11), 7687-7692, 2002.

FERRARO, M. J. et al. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão; **NCCLS Norma aprovada-Oitava edição**, v.23, n.1, 2003.

FENG, T.; LI, Z. H.; YIN, X. et al. New benzene derivatives from cultures of ascomycete *Daldinia concentrica*. **Natural products and bioprospecting**, v. 3, n. 4, p. 150-153, 2013.

FLECK, M. P. D. A.; LOUZADA, S. N.; XAVIER, M. K. et al. Aplicação da versão em português do instrumento de avaliação da qualidade de vida da Organização Mundial da Saúde (WHOQOL-100). **Revista de saúde pública**. São Paulo. Vol. 33, n. 2 (abr. 1999), p. 198-205, 1999.

GLIENKE, C.; TONIAL, F.; GOMES-FIGUEIREDO, J. et al. Antimicrobial activity of endophytes from Brazilian medicinal plants. In **Antimicrobial agents. InTech**. 2012.

GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **Journal of natural products**, v. 60, n. 5, p. 519-524, 1997.

GOS, F. M., SAVI, D. C., SHAABAN, K. A. et al. Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). **Frontiers in Microbiology**, 8, 1642, 2017.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient.**, v.17, dez. 2006.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(1), 134-144, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33(3), 667-679, 2010.

- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.
- HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 9-18, 2004.
- HEALY, P. C.; HOCKING, A.; TRAN-DINH, N. et al. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2373-2378, 2004.
- HENLEY, D.; ISBILL, M.; FERNANDO, R. et al. Paclitaxel induced apoptosis in breast cancer cells requires cell cycle transit but not Cdc2 activity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 59, 235-49, 2007.
- HESS, S. C. et al. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 47, n. 2, p. 97-100, 1995.
- HO, C.; HUANG, Y.; CHEN, C. Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. **Planta medica**, v. 68, n. 11, p. 975-979, 2002.
- HOKAMA, Y. M.; SAVI, D.; ASSAD, B. et al. ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED. **Endophytic fungi: diversity, characterization and biocontrol**, p. 93, 2017.
- KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S. et al. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 288-292, 2001.
- KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOHANAN, P.R.; AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Plos One**, v. 8, 2013.
- KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 103-106, 2008.

KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. Isolation and identification of an anticancer drug, taxol from *Phyllosticta tabernaemontanae*, a leaf spot fungus of an angiosperm, *Wrightia tinctoria*. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 40, 2009.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.

LEE, I.K.; KIM, S.E.; YEOM, J.H. et al. Daldinan A, a novel isoindolinone antioxidant from the ascomycete *Daldinia concentrica*. *J. Antibiot.* 65, 95–97, 2012.

LIARZI, O.; BAR, E.; LEWINSOHN, E. et al. Use of the endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio-control agents. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168242, 2016.

LIN, C.N.; CHUNG, M.I.; LIOU, S.J. et al. Synthesis and anti-inflammatory effects of xanthone derivatives. *J. Pharmacy Pharmacol.* 48, 532–538, 1996.

LINH, D.T.P.; HIEN, B.T.T.; QUE, D.D. et al. Cytotoxic constituents from the Vietnamese fungus *Xylaria schweinitzii*. **Nat. Prod. Commun.** 9, 659–660, 2014.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 241-247, 2008.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospecção de extratos de Croton Urucurana Baill e seus fungos endofíticos**. 138 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Patologia Básica, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MACÍAS-RUBALCAVA, M L.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 15, 2017.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; CHERIGO, L.; HIGGINBOTHAM, S. et al. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **International Microbiology**, 14(2), 95, 2011.

MOELLERING JR, R. C. Antibiotic resistance: lessons for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. Supplement_1, p. S135-S140, 1998.

MOLLINEDO PATZI, M. A.; GONZÁLES VILLALOBOS, C. Bacterias Gram Negativas. **Revista de Actualización Clínica Investiga**, v. 49, p. 2609, 2014.

NASCIMENTO, G. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, 31(4), 247-256, 2000.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. Santiago, v. 3, p. 69-72, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, 2008.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M. D. et al. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**, 58(3), 613-616, 2001.

PARK, S.J.; Wu, C.H.; GORDON, J. D. et al. Taxol induces caspase- 10-dependent apoptosis. **Journal of Biology and Chemistry**. 279, 51057-67, 2004.

PINHEIRO, E. A; PINA, J. R., FEITOSA, A. O. et al. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 49, n. 1, p. 3-6, 2017.

- PINTO, D. C.; FUZZATI, N.; PAZMINO, X. C.; HOSTETTMANN, K. Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. **Phytochemistry**, 37(3), 875-878., 1994.
- PAZIAN, G M.; DA SILVA SASS, Zaiara Francis. Resistência bacteriana a antibióticos. **Revista Cesumar–Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 11, n. 1, p. 157-163, 2007.
- PELEG, A. Y., SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, 21(3), 538-582, 2008.
- PONGCHAROEN, W., RUKACHAISIRIKUL, V., ISAKA, M. et al. Cytotoxic metabolites from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 9653. *Chemical and pharmaceutical Bulletin*, 55(11), 1647-1648, 2007.
- PORNPAAKAKUL, S., LIANGSAKUL, J., NGAMROJANAVANICH, N. et al. Cytotoxic activity of four xanthenes from *Emericella variecolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. **Archives of pharmacological research**, 29(2), 140-144, 2006.
- POTT, A.; POTT, V. J. Fitogeografia do Pantanal. **America**, p. 1-4, 2009.
- POTT, A.; OLIVEIRA, A. K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A., et al. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 265-273, 2011.
- PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T. et al. An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that Produces Camptothecin. **Journal of natural products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.
- QUANG, D. N.; LAM, D. M.; HANH, N. T. H.; QUE, D. D. Cytotoxic constituents from the fungus *Daldinia concentrica* (Xylariaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 4-5, p. 486-490, 2013.
- RATES, S. M. K.. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.
- REYES-CHILPA, R; JIMENEZ-ESTRADA, M.; ESTRADA-MUÑOZ, E. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1901-1911, 1997.

- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.
- SACCARO JR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.
- SAMŠINÁKOVÁ, A. Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n. 3, p. 395-400, 1966.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 319-343, 1998.
- SANTOS DE QUEIROZ, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, 2004
- SAVI, D. C.; SHAABAN, K. A.; VARGAS, N. et al. *Microbispora* sp. LGMB259 Endophytic Actinomycete Isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) Producing β -Carbolines and Indoles with Biological Activity. **Current microbiology**, v. 70, n. 3, p. 345-354, 2015.
- SAVI, D. C. **Biodiversidade e bioprospecção de actinomicetos da planta *Vochysia divergens* (Cambará)** 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites** Paper presented at the British Mycological Society symposium on Fungal Bioactive Compounds, held at the University of Wales Swansea on 22–27 April 2001. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 12,

- SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, 29(4), 844, 2006.
- SIGMA ALDRICH, Cell Viability and Proliferation Assays. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>. Acessado em: 14 de nov. de 2017.
- SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. The organic chemistry of drug design and drug action. **Academic press**, 2014.
2000.
- SILVA, M. P. D. MAURO, R.; MOURÃO, G. et al. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista brasileira de Botânica**, v. 23, n. 2, p. 143-152, 2000.
- SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T. et al. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 217-220, 2001.
- SENTHIL K., R.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. K. Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of Cupressus sp. **Engineering in Life Sciences**, v. 8, n. 4, p. 438-446, 2008.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G., YANG, X., SEARS, J.E et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, 142(2), 435-440, 1996.
- SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 9-19, 2009.
- SVOBODA, Gordon H.; BLAKE, David A. The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **The catharanthus alkaloids**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 45-83, 1975.

- TARMAN, K.; PALM, G. J.; WENDE, K.; LINDEQUIST, U. Biological and chemical study of two Indonesian marine endophytic fungi. **Planta Medica**, 77(12), SL71, 2011.
- TAN, M.; YU, D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. **Advances in Experience Medical Biology**. 608, 119-29, 2007.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F.. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- TONIAL, F., MAIA, B. H., GOEMES-FIGUEIREDO, J. A. et al. Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. **Current microbiology**, 72(2), 173-183, 2016.
- USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N. D.; DI STASI, L. C. et al. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(4), 717-719, 2007.
- VITRAL, J. C. D. A., SILVA, A. A., SOUZA, M. A. Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. **Pesqui. bras. odontopediatria clín. integr**, 359-365, 2008.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E. et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*¹, 2. **Journal of the American Chemical Society**, 88(16), 3888-3890, 1966.
- WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. **American Society for Microbiology (ASM)**, 2003.
- WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; RUSSELL, A. D. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 94(2), 240-247, 2003.
- WEI, H., XU, Y. M., ESPINOSA-ARTILES, P. Sesquiterpenes and other constituents of *Xylaria* sp. NC1214, a fungal endophyte of the moss *Hypnum* sp. **Phytochemistry**, 118, 102-108, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Geneva: World Health Organization**, 2017.

ZHANG, J. Y.; TAO, L. Y.; LIANG, Y. J. et al. Secalonic acid D induced leukemia cell apoptosis and cell cycle arrest of G1 with involvement of GSK-3 β / β -catenin/c-Myc pathway. **Cell Cycle**, v. 8, n. 15, p. 2444-2450, 2009.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.